

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
LISBOA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas e Parasitárias



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Síndrome Respiratória do Médio Oriente
(Middle East Respiratory Syndrome)

Sara Carolina Rocha Pereira de Jesus

Número de aluno: 14542

Orientador: Dr. Fernando Maltez

Ano Letivo 2015/2016

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, no contexto da conclusão do Curso de Mestrado Integrado em Medicina.

Este Trabalho Final foi escrito de acordo com o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, em vigor desde 2009.

Índice Geral

1. Lista de abreviaturas.....	4
2. Índice de Figuras.....	6
3. Índice de Tabelas	6
4. Resumo	7
5. Abstract	7
6. Introdução	8
7. Taxonomia e nomenclatura.....	9
8. Epidemiologia	11
9. Patogénese e transmissão	15
10. Manifestações clínicas	17
11. Diagnóstico.....	19
12. Tratamento	24
13. Prevenção e controlo da infeção.....	26
14. Conclusões.....	29
15. Agradecimentos	30
16. Bibliografia.....	31

Lista de abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARDS – *Acute Respiratory Distress Syndrome*

ARN – ácido ribonucleico

β -CoV – beta-coronavírus

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CoV - coronavírus

DPP4 – recetor dipeptidil peptidase-4

EPI – equipamentos de proteção individual

FDA – *Food and Drugs Administration*

GTP –guanosina trifosfato

IFN – interferão

IFN- α – interferão alfa

IFN- β - interferão beta

IFN- ω - interferão ómega

IFN- κ - interferão kapa

IFN- ϵ - interferão epsilon

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

MERS – *Middle East Respiratory Syndrome*

MERS-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORFs – *open reading frames*

ORF 1a - *open reading frame* com localização e sequência única de nucleótidos

ORF 1b - *open reading frame* com localização e sequência única de nucleótidos

PCR – reação de cadeia em polimerase

Proteína E – proteína de envólucro

Proteína N – proteína de nucleocápside

Proteína M – proteína de membrana

Proteína S – proteína de superfície

REGN3051 – anticorpo monoclonal humano

REGN3048 – anticorpo monoclonal humano

RT-PCR – reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa

rRT-PCR – reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa, em tempo real.

R0 – número de reprodução base

SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SARS-CoV- *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

S1 – subunidade 1

S2 – subunidade 2

upE - parte montante do gene da proteína E

VIH– vírus da imunodeficiência humana

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da taxonomia de <i>Coronaviridae</i>	9
Figura 2 - Diagrama genómico e esquemático da estrutura de MERS-CoV	10
Figura 3 - Distribuição geográfica de casos confirmados de MERS-CoV(2012-2016)	12
Figura 4 - Ciclo de transmissão de MERS-CoV.....	16
Figura 5 - Algoritmo recomendado para investigação laboratorial de infeção por MERS-CoV.....	22

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Definição de caso suspeito de infeção por MERS-CoV de acordo com a Direção Geral da Saúde.	19
Tabela 2 - Tipos de amostras a serem colhidas para o diagnóstico de infeção por MERS-CoV, em doentes sintomáticos e contactos assintomáticos. ⁴⁹	21
Tabela 3 – Medidas gerais de controlo nosocomial da infeção por MERS-CoV. ⁴⁹	27

Resumo

A Síndrome Respiratória do Médio Oriente ou *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS) é uma doença infecciosa emergente, causada por um novo coronavírus (CoV) designado por *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), que é um novo membro da linhagem C dos beta-coronavírus (β -CoV). A maior parte dos casos descritos, estão epidemiologicamente ligados ao Médio Oriente e, verificou-se que a doença é particularmente grave em doentes com comorbilidades. O número crescente de casos notificados de infeção em humanos e, a sua elevada taxa de mortalidade, tornam urgente o desenvolvimento de um tratamento eficaz e seguro. Nesta revisão é discutida a transmissão e patogénese do vírus, os meios de diagnóstico, as manifestações clínicas, o tratamento e as medidas de controlo da infeção.

Palavras-chave: MERS-CoV, Síndrome Respiratória do Médio Oriente, infeção.

Abstract

Middle East Respiratory Syndrome (MERS) is an emerging infectious disease, caused by a novel coronavirus (CoV) designated as *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), which is a new member in the C lineage of beta-coronavirus (β -CoV). The majority of described cases are epidemiologically linked to the Middle East, and the disease is particularly severe in patients with comorbidities. The increased number of notified cases of human infection and the high mortality rate make the development of an effective and safe treatment of the outmost importance. In this review, it is discussed the transmission and viral pathogenesis, diagnostic process, clinical presentations, treatment and measures of infection control.

Keywords: MERS-CoV, Middle East Respiratory Syndrome, infection.

Introdução

O Médio Oriente é uma região que engloba 17 países com diversos grupos étnicos. As práticas religiosas e a pluralidade de costumes, como por exemplo, as peregrinações anuais e convivência e importância de certos animais para o quotidiano da população, tornam esta região num local propício à ocorrência de doenças infecciosas.

Em setembro de 2012, foi isolado pela primeira vez MERS-CoV na Arábia Saudita. O vírus foi identificado num homem de 60 anos de idade, de nacionalidade saudita, a quem fora diagnosticada uma pneumonia adquirida na comunidade. A deterioração rápida do seu estado clínico, com subsequente insuficiência renal e falência multi-órgão conduziram à sua morte.¹

Desde então, já foram notificados mais 1.728 casos de infeção por MERS-CoV (confirmados laboratorialmente), espalhados um pouco por todo o Mundo, dos quais, resultaram 624 mortes, estimando-se, que a taxa de letalidade da doença seja de cerca de 36%. A maioria destes doentes tinham estadia ou contacto com pessoas que estiveram naquela região geográfica, por este motivo, o vírus, é considerado, globalmente, como um agente com grande potencial pandémico, uma vez que se transmite pessoa a pessoa e as opções terapêuticas disponíveis são, para já, limitadas e apenas de suporte.² Este novo vírus é aparentado com o coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda ou *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) e ambos causam infeções graves do trato respiratório, que estão associadas a elevadas taxas de mortalidade.³ Um dos grandes desafios para impedir a propagação de MERS-CoV é o de conhecer bem a sua forma de transmissão, o que até à data ainda não está bem determinado, porque se trata de um microrganismo identificado há muito pouco tempo.⁴

Nesta tese faz-se uma revisão da estrutura vírica, da epidemiologia, das manifestações clínicas, da patogénese, do diagnóstico, das opções terapêuticas e da imunização contra MERS-CoV, procurando, também, identificar os fatores prioritários para o controlo da infeção e da epidemia.²

Taxonomia e nomenclatura

Os CoV são uma grande família de vírus de cadeia simples de ácido ribonucleico (ARN), encapsulados, taxonomicamente afiliados à família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*⁵ (figura 1). De acordo com a análise serológica e com as suas características genotípicas, podem ser classificados em quatro espécies: alfa, beta, gama e delta coronavírus.⁶

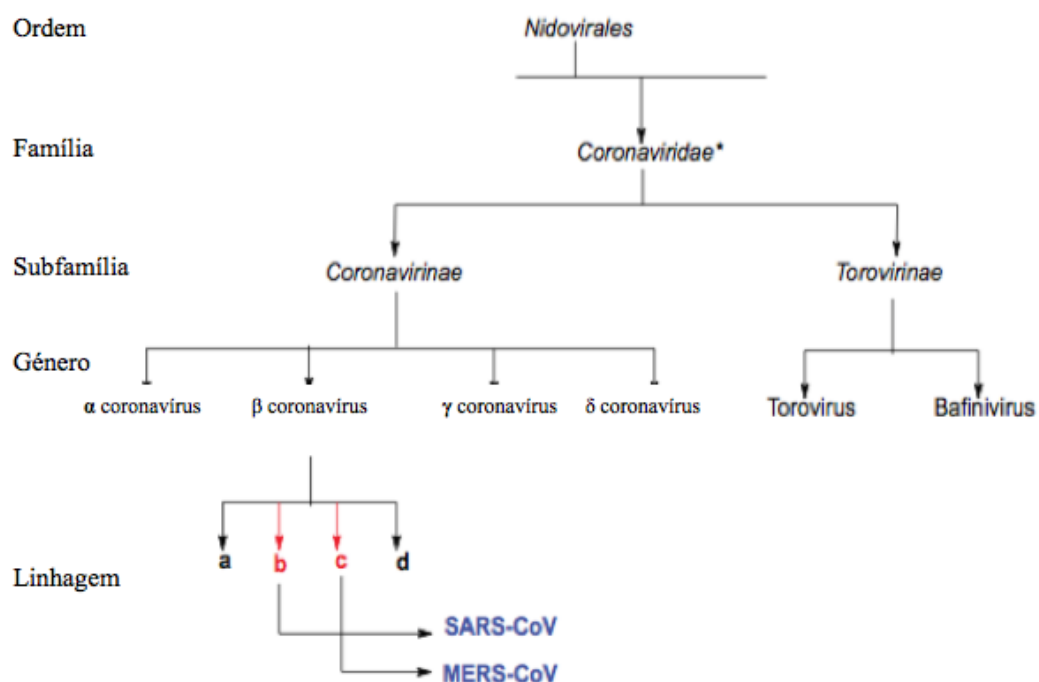


Figura 1 - Representação esquemática da taxonomia de *Coronaviridae*.⁷

Os CoV são um grupo de vírus que infetam, tipicamente, o trato respiratório e intestinal dos mamíferos e que são assim designados, porque na observação em microscopia eletrónica, as suas proteínas de superfície aparentam uma configuração em “sol” ou em “coroa”.⁸

MERS-CoV é um β -CoV, com um genoma que contém 30 pares de quilobases em comprimento*, que consistem em 11 *open reading frames* funcionais (ORFs).⁹ ORFs são sequências de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codificam proteínas e que estão localizadas entre um codão de iniciação e um codão de paragem.¹⁰ Estas sequências após serem mapeadas, podem ser muito úteis para o diagnóstico de infeção por MERS-CoV.

* unidade de medida em Biologia Molecular que significa 1.000 pares de bases de ADN ou ARN.

O genoma de MERS-CoV codifica seis proteínas, que são homólogas das existentes nos restantes CoV e que incluem duas proteínas replicases e quatro proteínas estruturais, designadamente *spike* ou proteína de superfície (S); *envelope* ou proteína de envólucro (E), *membrane* ou proteína de membrana (M); *nucleocapside* ou proteína de nucleocápside (N),¹¹ conforme se mostra na figura 2. A proteína E é uma proteína transmembranária que forma um canal de iões na superfície viral. A proteína N desempenha um papel importante a encapsular o ARN genómico e a interagir com a proteína M.¹² A proteína S de MERS-CoV é uma glicoproteína transmembranar tipo I, que contém 1.353 aminoácidos e pode ser clivada em subunidade um (S1) e subunidade dois (S2). A S1 contém o domínio de ligação do recetor que é responsável pela ligação ao recetor da célula alvo. A S2 é responsável por mediar a fusão da membrana.⁷

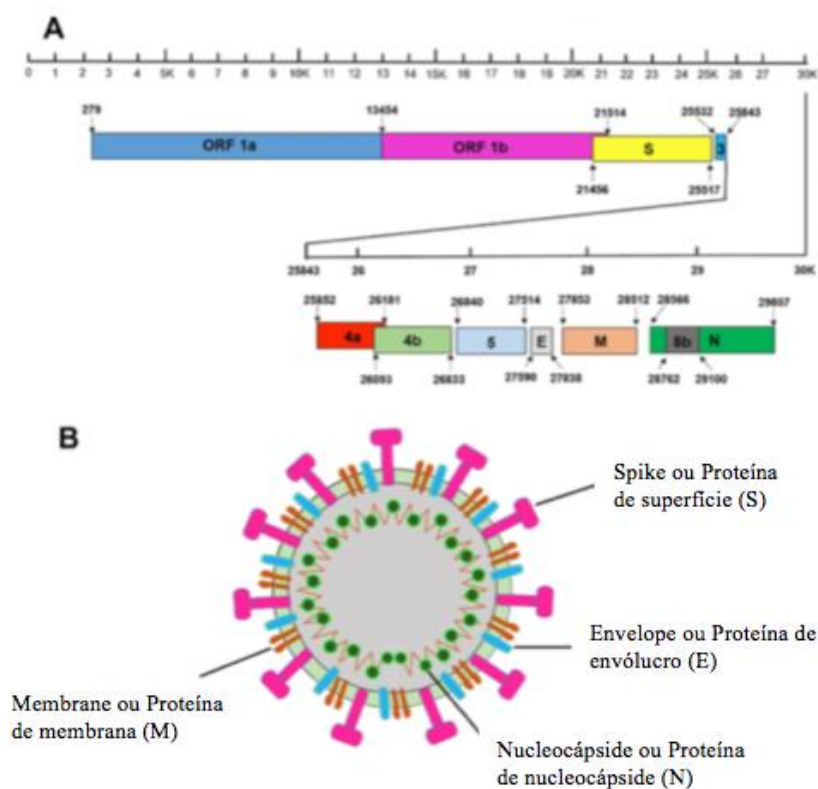


Figura 2 - Diagrama genómico e esquemático da estrutura de MERS-CoV.⁹

Epidemiologia

A emergência de MERS-CoV no Médio Oriente desencadeou uma resposta rápida por parte das autoridades de Saúde Pública com a investigação a concentrar os seus esforços, para entender a epidemiologia dos surtos, para identificar potenciais reservatórios não humanos do vírus, (naturais e intermediários) e para desenvolver potenciais terapêuticas.¹³

MERS-CoV está relacionado geneticamente com CoV isolado em morcegos existentes na China, Arábia Saudita, Europa e África,¹ mas, até ao momento, não há evidência de que algum dos morcegos dessas regiões, seja reservatório deste novo vírus.¹⁴ Atualmente, os camelos dromedários são considerados os hospedeiros naturais de MERS-CoV, algo, que é confirmado por análises serológicas, as quais sugerem, que mais de 90% destes mamíferos adultos do Médio Oriente e África são seropositivos para MERS-CoV.¹⁵ No entanto, a importância dos camelos como fonte de transmissão da infeção ao homem continua controversa, já que, muitos doentes afirmaram que não tiveram contacto com estes animais.¹⁴

Apesar de MERS-CoV ter sido isolado pela primeira vez em setembro de 2012, um estudo retrospectivo permitiu concluir que o primeiro surto da doença ocorreu na Jordânia, em abril de 2012, tendo afetado 13 indivíduos. Este diagnóstico retrospectivo só foi possível através da colheita e análise de amostras de sangue pela técnica de reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa, em tempo real (rRT-PCR), que mostraram positividade para MERS-CoV. Em comparação com outros casos, o maior número de sobreviventes verificado neste surto (nove), está, provavelmente relacionado com a idade jovem dos doentes investigados e com a ausência de comorbilidades. Mais ainda, as práticas de controlo de infeção, durante este surto, podem ter sido importantes na prevenção da transmissão de MERS-CoV em contexto hospitalar.¹⁶

Desde setembro de 2012, foram notificados vários casos de infeção por MERS-CoV, provenientes de 26 países (figura 3). Os casos primários de MERS-CoV, isto é, em que se admite a transmissão direta de vírus, do reservatório natural ao homem, estão limitados a seis países do Médio Oriente (Arábia Saudita, Emirados Árabes Unidos, Qatar, Jordânia, Oman e Kuwait). Por outro lado, os casos relatados nos restantes países verificaram-se em indivíduos que visitaram o Médio Oriente, e que foram diagnosticados depois de regressarem ao seu país de origem. Estes indivíduos constituíram, de igual forma, uma fonte de transmissão a outras pessoas, originando nos seus países, vários casos secundários. A infeção por MERS-

CoV já foi identificada na Europa (França, Itália, Grécia, Holanda, Áustria, Reino Unido e Alemanha)²³, na África (Tunísia e Argélia), na Ásia (Tailândia, Malásia e Filipinas) e na América do Norte (Estados Unidos da América).

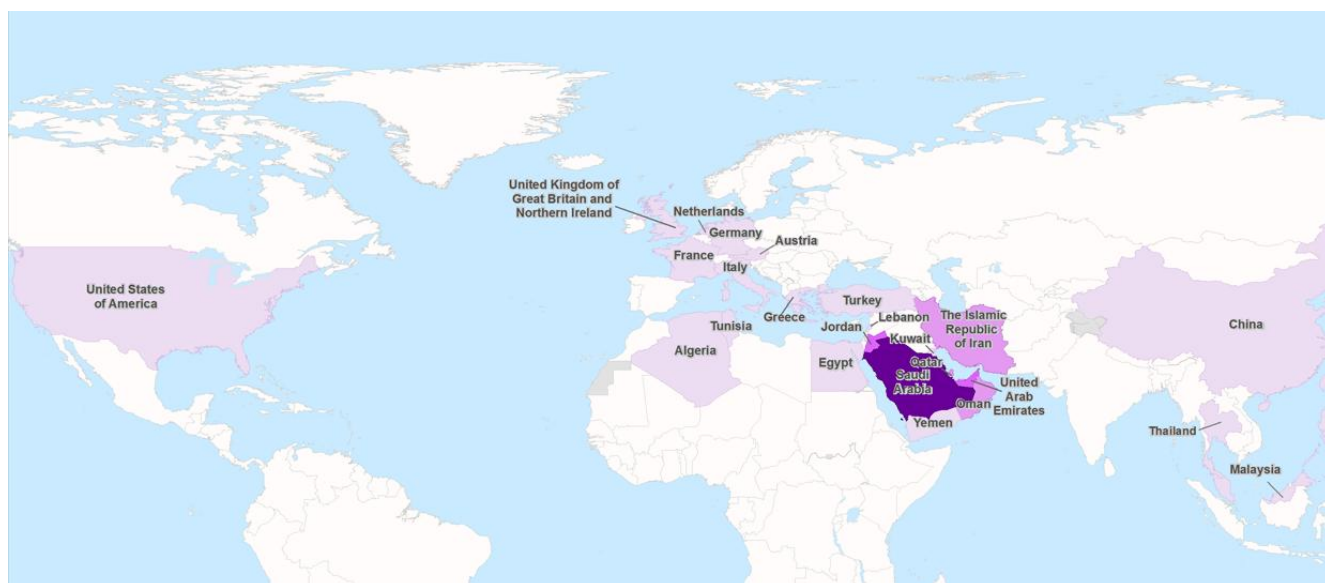


Figura 3 – Distribuição geográfica de casos confirmados de MERS-CoV (2012-2016).⁴⁹

Em cerca de 75% dos casos já diagnosticados, os doentes apresentavam comorbilidades.¹⁸ As mais frequentes foram a diabetes *mellitus*, a hipertensão, a obesidade, as neoplasias, as doenças crónicas hepáticas, cardíacas e pulmonares.¹⁹ Descrevem-se de seguida, alguns dos casos importados:

- **França**

A 7 de maio de 2013 foi confirmado o primeiro caso de infeção por MERS-CoV, em doente do sexo masculino, com 64 anos, e antecedentes de transplante renal, que iniciara quadro clínico de febre (38,9°C) e diarreia, sem sintomas respiratórios, cinco dias após regressar de viagem aos Emirados Árabes Unidos. No dia seguinte foi internado por dispneia e tosse, e, por agravamento do quadro, transferido para unidade de cuidados intensivos onde viria a falecer 29 dias depois.²⁰

- **Tunísia**

A 5 de agosto de 2013 foi diagnosticado o primeiro caso de infecção por MERS-CoV, na Tunísia, em doente do sexo masculino, com 66 anos, e antecedentes de diabetes *mellitus* não tratada, que referia calafrios, artralgias, tosse, dispneia e febre, após regressar de viagem ao Qatar. Por agravamento do quadro clínico deslocou-se ao hospital, onde ficou internado e foi medicado com amoxicilina e ácido Clavulânico. Posteriormente, seria transferido para a unidade de cuidados intensivos por insuficiência respiratória aguda e choque, onde, por falência orgânica múltipla, se verificou o óbito. A infecção foi confirmada por análise de uma amostra de soro por rRT-PCR, realizada no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).²¹

- **Itália**

A 31 de maio de 2013 foi confirmado o primeiro caso de infecção por MERS-CoV, em Itália, em doente do sexo masculino, com 45 anos, saudável, de nacionalidade italiana, que iniciou quadro de febre (38°C), tosse e dispneia, um dia antes do seu regresso a Florença após viagem à Jordânia. Foi internado em Unidade de Doenças Infeciosas e Tropicais, onde as amostras nasofaríngeas analisadas por rRT-PCR, confirmaram o diagnóstico. Após melhoria clínica, o doente teve alta hospitalar.²²

- **Grécia**

A 18 de abril de 2014 foi confirmado o primeiro caso de infecção por MERS-CoV, na Grécia, em doente do sexo masculino, de 69 anos, de nacionalidade grega e residente em Jeddah (Arábia Saudita), que iniciou quadro de febre (38,3°C) e diarreia algumas horas após regressar na véspera a Atenas. A infecção foi confirmada através da análise de uma amostra orofaríngea por rT-PCR.²³

- **Estados Unidos da América**

A 2 de maio de 2014 foi confirmado o primeiro caso de infecção por MERS-CoV, em doente do sexo masculino, de 65 anos, médico, de nacionalidade norte-americana, com antecedentes de hipertensão arterial e doença arterial coronária, residente na Arábia Saudita, que iniciou quadro de fadiga e mialgias, seis dias antes de regressar ao seu país de origem. Quatro dias após a chegada apresentou febre (38,6°C temperatura oral), dispneia, tosse e taquipneia, o que motivou o seu internamento num hospital local durante 11 dias e onde foram colhidas amostras do soro, nas quais pela técnica de rRT-PCR, se confirmou a infecção

por MERS-CoV. O doente referiu que existiam doentes com MERS-CoV no hospital onde trabalhava em Riyadh, negando, no entanto, qualquer contacto próximo com os mesmos.²⁴

- **Holanda**

A 13 de maio de 2014 foi confirmado o primeiro caso de infeção por MERS-CoV, na Holanda, em doente do sexo masculino, de 70 anos, e nacionalidade holandesa, com antecedentes de patologia cardíaca e diabetes *mellitus*. Durante uma viagem à Arábia Saudita, iniciou quadro clínico caracterizado por diarreia, náuseas e anorexia, complicado de tosse e dispneia no dia de regresso à Holanda, motivo por que foi internado. A irmã do doente, de 73 anos, apresentou, também, quadro de diarreia, tosse e dispneia ligeiras, no entanto, não procurou tratamento médico. Foram colhidas amostras orofaríngeas de ambos os irmãos, tendo-se comprovada infeção por MERS-CoV.²⁵

- **Alemanha**

Em março de 2015 foi diagnosticado o primeiro caso de infeção por MERS-CoV, na Alemanha, em doente do sexo masculino, de 65 anos e nacionalidade alemã, que iniciou sintomas, três dias após o seu regresso de uma viagem a Abu Dhabi. Este caso não foi o primeiro a ser registado neste país, uma vez que, já em 2012, um doente de nacionalidade Qatari, e depois em 2013 um outro doente, proveniente dos Emirados Árabes Unidos tinham sido transferidos para a Alemanha para receberem tratamento.¹⁷

- **Coreia do Sul**

Em julho de 2015 na Coreia do Sul, verificou-se um surto de MERS-CoV, de que resultaram 186 casos confirmados de doença e 36 mortes. A rapidez com que a infeção disseminou fez temer entre a comunidade científica, que o vírus pudesse estar a mutar, contudo, cientistas sul coreanos verificaram que isso não tinha acontecido e que o vírus isolado apresentava homogeneidade de cerca de 99% em relação ao vírus original encontrado na Arábia Saudita.²⁶ O surto na Coreia do Sul teve início com um doente que viajou pelo Médio Oriente no mês anterior. Entre 18 de abril e 2 de maio esteve no Bahrain, tendo visitado os Emirados Árabes Unidos (29 e 30 de abril)²⁷ e a Arábia Saudita (1 e 2 de maio). Já de regresso à Coreia do Sul sentiu-se indisposto, o que motivou a ida a uma clínica local em Pyeongtaek, província de Gyeonggi, a 12, 14 e 15 de maio. Inicialmente, não referiu as recentes viagens pelo Médio Oriente. De 15 a 17 de maio, e pelas mesmas queixas, foi internado noutro hospital. Deslocou-se a outra clínica e, finalmente, foi internado num

hospital central em Seul. A 20 de maio foi-lhe diagnosticada infeção por MERS-CoV, foi isolado e, então, transferido para um hospital designado pelo governo sul-coreano para o tratamento de doentes com MERS. Este surto foi o maior que se verificou fora do Médio Oriente, chamando a atenção, de que é em contexto hospitalar que se verifica a maioria dos casos de transmissão entre humanos e, de que os profissionais de saúde representam um importante grupo de risco para a infeção por MERS-CoV. Os doentes e os visitantes dos hospitais podem estar mais vulneráveis, pelo contacto próximo com pessoas infetadas e os profissionais de saúde pelo uso inadequado de equipamento de proteção pessoal (EPI). De modo a evitar uma epidemia de MERS, é fundamental que haja um reconhecimento rápido desta doença, ou seja, um diagnóstico precoce que permita o isolamento imediato de doentes e um acompanhamento médico protegido. É necessário, também, uma investigação epidemiológica rigorosa, de forma a detetar os contactos que o doente teve e a permitir esses indivíduos, o rastreio de infeção, o seu tratamento e a interrupção da cadeia de transmissão.⁴

- **Tailândia**

O caso mais recente de infeção confirmada verificou-se na Tailândia, a 24 de janeiro de 2016, num doente de 71 anos de idade, de nacionalidade Oman, que chegou a Banguecoque a 22 de janeiro, em busca de tratamento médico. Foi internado e, no dia seguinte foi diagnosticado com MERS-CoV. Os primeiros sintomas surgiram a 14 de janeiro, ainda em Oman e, conseguindo-se apurar que o doente teve contacto com camelos, durante os 14 dias que antecederam o início da sintomatologia. Neste caso, foram tomadas as medidas necessárias para identificar todos os contactos que o doente teve em Oman, durante a viagem para a Tailândia, e em Banguecoque.¹⁷

Patogénese e transmissão

MERS-CoV tem origem zoonótica (os dromedários são considerados os hospedeiros naturais), no entanto, a passagem da infeção para os humanos não está esclarecida^{28,29} (figura 4).

A patogenecidade de MERS-CoV encontra-se ainda pouco estudada e não totalmente compreendida, para o que tem contribuído a ausência de amostras orgânicas em número suficiente, que possam permitir caracterizar melhor as respostas imune e adaptativa nos

casos humanos já diagnosticados. Também, devido a razões religiosas e culturais, a examinação pós-mortem dos doentes islâmicos que morreram devido a MERS, só muito raramente, foi efectuada. Por estas razões, o conhecimento da histopatologia e patogénese de MERS está limitado às descobertas feitas *in vitro*, *ex vivo* e em experimentação animal.²Atualmente, a identificação dos recetores funcionais envolvidos na infeção por MERS-CoV representa um tema central para o entendimento da patogénese vírica.³⁰



Figura 4 - Ciclo de transmissão de MERS-CoV.¹³

A entrada de coronavírus na célula-alvo pode ocorrer por duas vias — endocitose ou fusão da membrana plasmática. A via de fusão da membrana plasmática é a principal via para a entrada de MERS-CoV.³¹ A infeção por MERS-CoV é iniciada pela ligação da partícula vírica (proteína S) da superfície do vírus com o recetor dipeptidilpeptidase-4 (DPP4) da superfície da célula do hospedeiro.^{30,32} Assim, este local de ligação, se bloqueado, pode impedir a infeção e por isso, tem sido objeto de experimentação farmacológica.³³

Nos doentes com MERS, é observada uma resposta inflamatória sistémica acentuada, acompanhada de envolvimento multi-órgão e de anomalias hematológicas.² Os estudos realizados com culturas *ex vivo* de células dendríticas humanas e de macrófagos confirmaram que MERS-CoV consegue infetar estes tipos de células e levar ao recrutamento e infiltração

do tecido pulmonar por um elevado número destas células. Também, a sequestração de linfócitos nos tecidos infetados pode explicar a acentuada linfopenia periférica que é habitualmente verificada com MERS.³⁴ O recetor DPP4 está largamente presente no epitélio brônquico não-ciliado e nas células epiteliais dos rins, do intestino grosso, do fígado, da glândula parótida e até mesmo dos testículos e próstata. Esta grande distribuição pode, igualmente, justificar a diversidade de manifestações clínicas observadas na infeção por MERS-CoV.^{8,35}

Em relação à transmissão de MERS-CoV, acredita-se que, à semelhança de outros CoV, se transmite pessoa a pessoa através das secreções respiratórias particularmente, por contacto direto e/ou indireto e, em contexto hospitalar no decurso de manobras de intubação ou de reanimação.³⁶ A transmissão nosocomial e a exposição de cuidadores a casos confirmados são as principais formas de propagação da doença.³⁷

A grande concentração de pessoas num determinado espaço físico, como é por exemplo a *Hajj* (peregrinação realizada anualmente pelos muçulmanos a Meca), predispõe a um aumento teórico do risco de surtos de MERS. Apesar disto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomenda para já, qualquer tipo de restrição em viagens ou em trocas comerciais.¹³

O número de reprodução base (R_0) é um indicador utilizado em epidemiologia, que mede o número de casos secundários, gerados por um caso de doença numa população não infetada. Um R_0 inferior a um é considerado auto-limitado dentro de uma população. O R_0 de MERS-CoV é até à data, incerto.

Manifestações clínicas

O quadro clínico da infeção por MERS-CoV pode variar do estágio assintomático ou com sintomas respiratórios moderados, à doença respiratória aguda grave e à morte.³⁶ O quadro clínico mais típico de MERS inclui febre, tosse e dispneia.¹⁷ Outros sintomas que podem ocorrer são os calafrios, a odinofagia, a rinorreia, a pieira, a toracalgia, as mialgias, as cefaleias e o mal-estar geral.³⁸ A pneumonia é um achado frequente, mas nem sempre está presente. Alguns dias após o aparecimento dos sintomas iniciais pode existir deterioração clínica rápida com desenvolvimento de insuficiência respiratória, acompanhada de febre alta, taquipneia, taquicardia e hipotensão.³⁸ Cerca de um terço dos doentes manifestam sintomas gastrointestinais, que incluem diarreia, dor abdominal, náuseas e vómitos. A doença pode

causar insuficiência respiratória grave que requer ventilação mecânica e internamento em Unidade de Cuidados Intensivos. Aproximadamente 36% dos doentes com MERS-CoV morreram. Os idosos, os imunodeprimidos ou os doentes com patologia crónica (neoplasias, doença pulmonar, cardíaca ou renal crónica, diabetes) pareceram ser os mais vulneráveis à doença grave causada pelo vírus.¹⁷

O período médio de incubação para casos secundários associados a transmissão entre humanos é de cinco dias, podendo variar entre dois a catorze dias. Em relação aos exames complementares de diagnóstico, o estudo radiográfico do tórax pode mostrar opacidades unilaterais ou bilaterais, infiltrados intersticiais, consolidação e derrame pleural. O estudo laboratorial à entrada pode incluir leucopenia, linfopenia, trombocitopenia e valores elevados de desidrogenase láctica. Anemia, coagulopatia e coagulação intravascular disseminada foram também relatadas em alguns casos. Ocasionalmente, podem observar-se outras alterações como elevação das transaminases, da troponina, da creatinina, da proteína C-reactiva, da procalcitonina, hipercaliémia, hiponatremia e baixos níveis de albumina.¹⁶

Relativamente à infeção por MERS-CoV em idade pediátrica, foram identificados até ao momento onze casos de infeção. Destes, nove estavam assintomáticos e todos foram descobertos em consequência da investigação efetuada nos doentes adultos. Os dois únicos casos sintomáticos verificaram-se em crianças que tinham patologia subjacente (fibrose quística e trissomia 21).³⁹

As consequências de MERS em grávidas e em fetos ainda não são totalmente conhecidas, no entanto, está descrito o caso de um nado-morto ocorrido aos cinco meses de gestação. A doente apresentou hemorragia vaginal e dor abdominal no sétimo dia de doença por infeção a MERS-CoV e entrou em trabalho de parto espontâneo.⁴⁰

A sintomatologia apresentada pelos doentes com MERS pode ser sobreponível às manifestações clínicas de infeção por outros vírus, como por exemplo, *influenza*, *parainfluenza* ou vírus sincicial respiratório. Desta forma, um conjunto de sintomas como febre, tosse, dispneia e uma história recente de viagem ao Médio Oriente, deve suscitar no profissional de saúde a suspeita de infeção por MERS-CoV.

Diagnóstico

Uma combinação de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais é utilizada pela OMS e pelo CDC, para a distinção entre caso suspeito (tabela 1), caso confirmado e contacto próximo. Estes critérios são de seguida descritos, conforme a Norma de Orientação Clínica nº 008/2015, da Direção-Geral da Saúde, que foi atualizada a 05/08/2015.

- **Caso suspeito**

Um indivíduo é considerado como caso suspeito, quando apresenta critérios clínicos e epidemiológicos, como os discriminados na tabela 1.

Tabela 1 - Definição de caso suspeito de infeção por MERS-CoV de acordo com a Direção Geral da Saúde.

Critérios clínicos		Critérios epidemiológicos		
<u>Doença grave</u> Febre e pneumonia ou ARDS (baseado em dados clínicos e/ou radiológicos) e sem outra etiologia que explique o quadro.	e	Estadia recente (nos 14 dias antes do início dos sintomas) em área onde a infeção por MERS-CoV tenha sido reportada ou contacto próximo com doente com doença respiratória aguda e estadia recente em área onde a infeção por MERS-CoV tenha sido reportada. ou Pessoa incluída em <i>cluster</i> de doença respiratória aguda nos 14 dias antes do início dos sintomas. ou Profissional de saúde que trabalha em unidade dedicada ao tratamento de doentes com doença respiratória aguda grave. ou Contacto direto com dromedários: exposição ao camelo dromedário ou consumo de produtos (carne crua, leite não pasteurizado, outro) em área onde a infeção por MERS-CoV tenha sido reportada, nos 14 dias antes do início dos sintomas.		
		e	<u>Doença moderada</u> Febre ou sintomas respiratórios (tosse e/ou dispneia sem ter necessariamente pneumonia)	
			História de permanência (como doente, profissional ou visitante) numa unidade de saúde em área onde a infeção por MERS-CoV tenha sido reportada nos 14 dias antes do início dos sintomas. ou Contacto próximo com um caso confirmado e sintomático de MERS-CoV, nos 14 dias antes do início dos sintomas.	

Legenda: ARDS – *Acute Respiratory Distress Syndrome*; MERS-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome*.

- **Caso confirmado**

Refere-se a um caso sob investigação para o qual se obtém confirmação laboratorial de infecção por MERS-CoV.

- **Contacto próximo**

Refere-se a um profissional de saúde que prestou cuidados diretos a um doente com MERS-CoV ou a membro da família ou a pessoa que tenha tido um contacto superior a 15 minutos, face-a-face (<1 metro), sem EPI, com um caso confirmado de MERS-CoV sintomático, em qualquer ambiente fechado.

- **Diagnóstico laboratorial** ³⁷

Atualmente, não existem características clínicas, bioquímicas ou radiológicas patognomónicas, que possam diferenciar com segurança a infecção por MERS-CoV de outras causas de pneumonia aguda comunitária ou nosocomial. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos em amostras de fluidos orgânicos são o método mais frequentemente utilizado para obter a confirmação laboratorial de MERS, usando-se um protocolo único que foi estabelecido no início da epidemia.

Qualquer caso sob investigação tem de ser submetido a diagnóstico laboratorial. Em Portugal, os produtos biológicos a serem testados por reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR) devem ser enviados para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

A recolha de produtos biológicos (tabela 2), dos quais devem existir três tipos de amostras, deve ser realizada pela seguinte ordem de preferência:

- I. colheita do trato respiratório inferior (expetoração, lavado bronco-alveolar, secreções brônquicas) ou líquido pleural;
- II. zaragatoa nasofaríngea e/ou zaragatoa orofaríngea;
- III. sangue e/ou soro;
- IV. fezes e/ou urina.

Tabela 2 - Tipos de amostras a serem colhidas para o diagnóstico de infecção por MERS-CoV, em doentes sintomáticos e contactos assintomáticos.¹⁷

Doente	Teste	Tipo de amostra	Tempo de colheita	Armazenamento e transporte
<u>Sintomático</u>	RT-PCR	- Trato Respiratório Inferior <ul style="list-style-type: none"> • expetoração • aspirado e lavado bronco-alveolar - Trato Respiratório Superior <ul style="list-style-type: none"> • zaragatoa nasofaríngea e orofaríngea • lavado e aspiração nasofaríngea - Soro - Fezes e urina	Colher amostra na apresentação inicial. Para confirmar a clearance do vírus, colher amostras até os resultados serem negativos duas vezes consecutivas.	<ul style="list-style-type: none"> • Se as amostras chegarem ao laboratório em menos de 72h, armazenar e enviar mantendo a 4°C.
<u>Sintomático</u>	Serologia	- Sangue	Colher a primeira amostra na primeira semana de doença e segunda amostra colhida duas a três semanas após a primeira.	<ul style="list-style-type: none"> • Se as amostras chegarem ao laboratório em mais de 72h, armazenar a - 80°C e enviar em gelo seco ou nitrogénio líquido.
<u>Contacto</u> <u>Assintomático</u>	PCR	- Zaragatoa nasofaríngea e orofaríngea - Expetoração	Efetuar dentro de 14 dias do último contacto documentado.	
	Serologia	- Sangue	Colher amostra dentro de 14 dias após o último contacto documentado e, outra amostra colhida duas a três semanas depois.	

Legenda: PCR – reação de polimerase em cadeia; RT-PCR - reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa

O MERS-CoV pode ser detetado no sangue, na urina e nas fezes, no entanto, as cargas víricas nessas amostras são muito inferiores às presentes no trato respiratório. A carga vírica por ser maior no trato respiratório inferior (em comparação com o trato respiratório superior), sugere, que os pulmões são o local primário de infecção.⁴¹

Se o teste inicial for negativo nas zaragatoas da nasofaringe e da orofaringe, mas o índice de suspeição for elevado, devem ser recolhidas novas amostras nas 24h seguintes, preferencialmente, do trato respiratório inferior ou, se tal não for possível, repetir as zaragatoas da nasofaringe e da orofaringe, de modo a confirmar ou infirmar a infecção por MERS-CoV.³⁷

- **Confirmação Laboratorial**

A confirmação de um caso de infecção por MERS-CoV baseia-se na detecção de sequências únicas de vírus ARN, através de rRT-PCR. Atualmente, o algoritmo recomendado inclui três testes disponíveis para o diagnóstico (figura 5). Um deles, tem como alvo a parte montante do gene da proteína E (upE), enquanto os outros dois, analisam outras porções do vírus, tais como, o *open reading frame 1b* (ORF 1b) e o *open reading frame 1a* (ORF 1a).¹⁷ O CDC criou ainda outro teste de diagnóstico, que tem como alvo o gene da proteína N de MERS-CoV e que serve de complemento aos testes acima descritos.

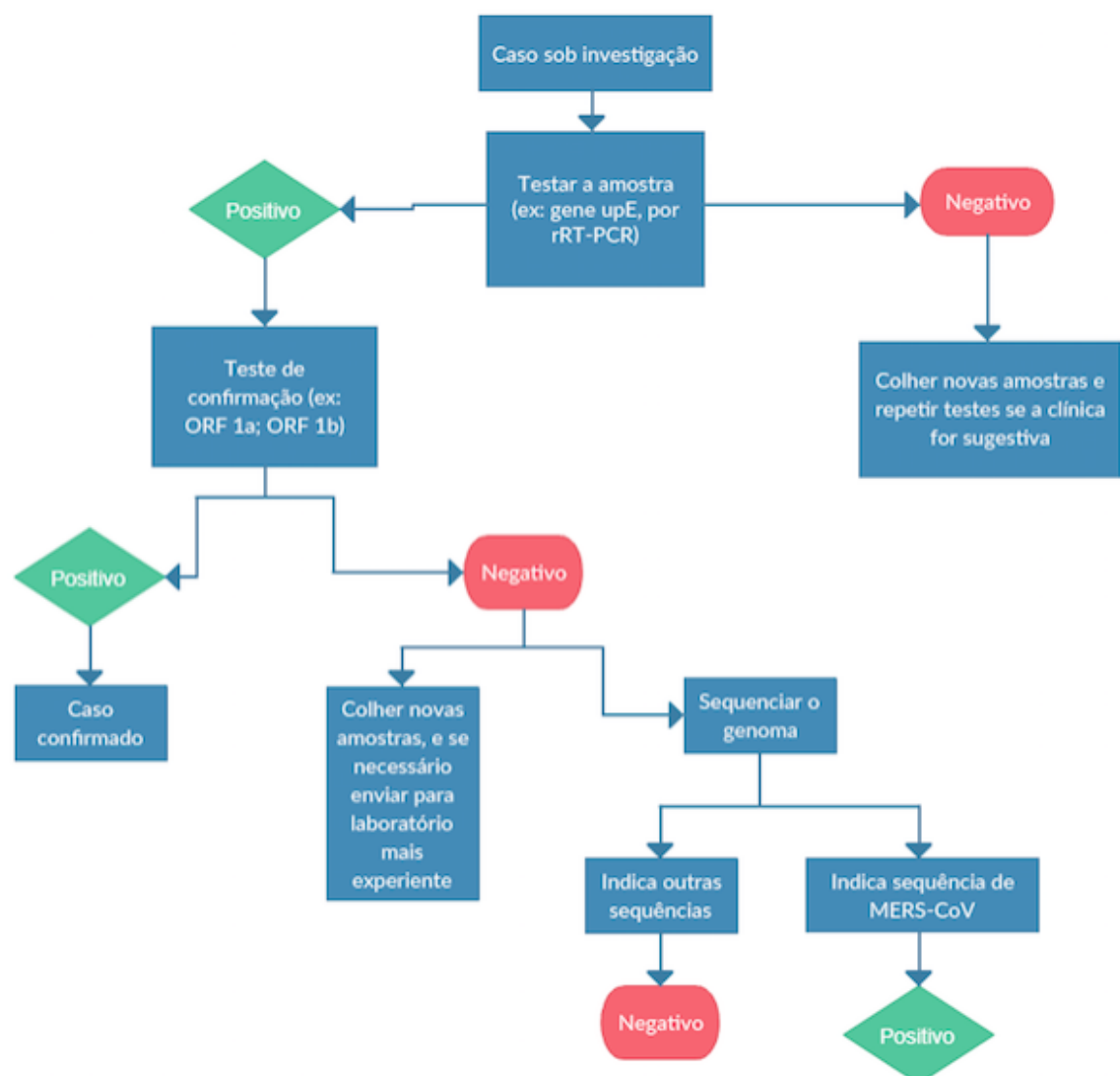


Figura 5 - Algoritmo recomendado para investigação laboratorial de infecção por MERS-CoV.¹⁷

Legenda: MERS-CoV- *Middle East Respiratory Syndrome*; ORF1a e ORF1b – *open reading frames* com localização e sequência única de nucleótidos; rRT-PCR – reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa, em tempo real; upE – montante do gene da proteína E.

Diversos fatores podem dar origem a resultados falsos negativos, pelo que uma série de resultados negativos não excluem, completamente, a possibilidade de infecção por MERS-CoV. Entre eles, está a má qualidade da amostra, a colheita tardia ou efetuada num estágio muito precoce da doença, o acondicionamento e envio inadequado da amostra ou, razões técnicas inerentes aos testes laboratoriais.¹⁷

Para considerar um caso como confirmado por laboratório tem de estar presente um dos critérios seguintes:¹⁷

- Um resultado positivo por RT-PCR, em pelo menos dois alvos diferentes no genoma do MERS-CoV.
- Um resultado positivo por RT-PCR para um alvo específico no genoma do MERS-CoV e uma amostra de sequência do genoma de MERS-CoV.

Quando se verifica um teste RT-PCR positivo para apenas um alvo do genoma do MERS-CoV, mas a história epidemiológica de possível exposição e as manifestações clínicas são consistentes com a doença, é considerado caso provável.¹⁷

Após a confirmação laboratorial, o médico assistente do doente deverá efetuar a notificação de caso confirmado no Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE).³⁷

Tratamento

Apesar de cerca de 36% dos doentes identificados com MERS terem apresentado progressão da doença e evolução para a morte, a maioria foi capaz de desenvolver respostas imunitárias e controlar a infeção. A identificação e a caracterização destes mecanismos de proteção imunitária em humanos, poderá fornecer pistas essenciais para futuras estratégias de intervenção a serem usadas na prática clínica.⁴¹

Atualmente, não existem tratamentos ou vacinas aprovadas, para respetivamente, tratar ou prevenir a infeção por MERS-CoV.^{3,8,9} A terapêutica sintomática, que inclui hidratação, antipiréticos, analgésicos e suporte ventilatório mantém-se como o pilar do tratamento.⁴² Antes do diagnóstico estar estabelecido, deve, de igual modo, instituir-se terapêutica antibacteriana empírica que atue contra os patógenos mais frequentes na comunidade, nomeadamente os atípicos. Não devem ser administrados corticóides em doses altas, devido aos seus potenciais efeitos secundários, como por exemplo, infeções oportunistas, necrose avascular e imunossupressão.¹⁷ Em doentes com dificuldade respiratória, hipoxémia ou choque deve ser administrado oxigénio suplementar e se, esta medida se revelar insuficiente, pode ser necessária ventilação mecânica (invasiva ou não-invasiva).

A investigação antivírica na era pós-SARS resultou na identificação de diversos compostos que poderão ter como alvo direto a replicação de coronavírus ou, a modulação da resposta imune à infeção e que poderão vir a ser eficazes⁴³ contra MERS-CoV^{8,43}. Contudo, o sucesso poderá vir ser alcançado com a revitalização de medicamentos já existentes e aprovados.⁷ Prova disso, é um estudo que comprovou que fármacos existentes em laboratórios e já aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA), como a cloroquina, clorpromazina, loperamida e lopinavir inibem a replicação de MERS-CoV *in vitro*, em concentrações micromolares baixas.⁴³ As vantagens desta abordagem englobam a disponibilidade comercial, a farmacocinética já conhecida e os perfis de segurança, também, bem descritos.²

Entre os fármacos com atividade antivírica, já conhecida contra outros coronavírus associados a infeção humana, como o SARS-CoV,² salienta-se o interferão (IFN) humano tipo I, do qual fazem parte o interferão beta (IFN- β), o interferão ómega (IFN- ω), o interferão kapa (IFN- κ), o interferão épsilon (IFN- ϵ) e 12 subtipos diferentes de interferão alfa (IFN- α), que desempenham um papel importante na resposta imune inata do

hospedeiro.⁴⁴ Os estudos mostram que o MERS-CoV é sensível aos interferões e que estes têm um efeito colateral importante em células vizinhas não infectadas, por induzirem um estado antivírico e ativarem as células da imunidade inata e a imunidade adaptativa.³⁵ O uso combinado de ribavirina, um análogo do nucleótido guanina que inibe a síntese de guanosina trifosfato (GTP) e a atividade vírica da RNA polimerase e de interferão $\alpha 2\beta$ mostrou resultados promissores, tanto *in vitro* como em estudos animais utilizando macacos *Rhesus*, ao exibir efeitos sinérgicos contra MERS-CoV.^{2,45} Todavia, a eficácia deste tratamento em humanos permanece incerta. Numa pequena coorte de casos de MERS na Arábia Saudita, cinco doentes que foram tratados com ribavirina, com interferão $\alpha 2\beta$ e com corticoesteróide, morreram. O atraso no início deste regime antivírico (duas semanas após início dos sintomas) pode ter reduzido o benefício do tratamento, uma vez que outro doente que o recebeu no dia da admissão hospitalar, sobreviveu.⁴⁶

Por outro lado, descreve-se o caso de um doente co-infectado por vírus da imunodeficiência humana (VIH) e MERS-CoV e que foi tratado com sucesso, utilizando o IFN- β em associação com a ribavirina.⁴⁷ Por ser caso único, não são possíveis grandes conclusões.

Prevenção e controlo da infeção

A hipótese de prevenção contra MERS-CoV, reside no desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para isolar anticorpos monoclonais humanos capazes de inibir a infeção, pela disrupção da interação entre a proteína S capsulada do MERS-CoV e o seu recetor celular DPP4.⁴⁸ É através deste mecanismo que, potencialmente é neutralizada a infecciosidade do MERS-CoV *in vitro*. Num desses estudos, foram criados dois novos anticorpos (REGN3051 e REGN3048) que manifestaram essa capacidade.³

O grande custo de produção é, também, um obstáculo importante para o desenvolvimento comercial destes anticorpos monoclonais, pelo que uma estratégia possível para reduzir os custos, seria a de conseguir que fossem exceccionalmente potentes, o que permitiria uma diminuição da dose necessária para atingir a eficácia pretendida, e em consequência, diminuir a despesa.⁸

Para avaliar a eficácia dos anticorpos neutralizantes das vacinas candidatas contra o MERS-CoV, é importante estabelecer um modelo animal eficaz, que possa mimetizar muitos dos resultados patológicos e imunes verificados nas infeções em humanos.²⁸ Contudo, verifica-se, que em contraste com SARS-CoV, que é capaz de causar infeção em várias espécies de mamíferos, MERS-CoV não infeta facilmente outras espécies animais (por exemplo, ratos, furões e hamsters).⁴¹ Após a infeção por MERS-CoV, estes animais não apresentaram manifestações clínicas, não foi detectado o vírus em amostras pulmonares ou extrapulmonares nem houve evidência de seroconversão. Este fato, sugere que o MERS-CoV não consegue entrar nas células do hospedeiro devido a variabilidade entre espécies na afinidade para o recetor DPP4,¹⁶ embora os ratos, apesar de serem resistentes à infeção por MERS-CoV, podem ser suscetíveis se o recetor DPP4 lhes for fornecido exogenamente.²⁹

A prevenção da transmissão de microrganismos em contexto hospitalar requer a aplicação de medidas de controlo da infeção (tabela 3). Estas medidas, incluem protocolos, que por sua vez têm em conta aspetos ambientais, estruturais e administrativos. A deteção precoce, triagem rápida e o isolamento de doentes com suspeita de MERS-CoV são fundamentais para garantir o controlo da infeção.³⁶

Tabela 3 – Medidas gerais de controlo nosocomial da infeção por MERS-CoV.¹⁷

Precauções gerais	<ul style="list-style-type: none"> - Higiene das mãos; - Uso de EPI; - Uso de proteção ocular, quando houver contacto próximo com doente com sintomas respiratórios (ex: tosse) - Prevenção picada de agulhas ou corto-perfurantes; - Recolha segura de resíduos; - Desinfecção e limpeza de equipamentos; - Controlo ambiental;
Precauções contra transmissão por via aérea	<ul style="list-style-type: none"> - Usar máscara se estiver a menos de um metro do doente; - Colocar doentes em quartos separados, ou agrupá-los se se tratar de igual etiologia de doença; - Limitar a movimentação do doente e garantir que usa máscara quando se encontrar fora do quarto. - Garantir que os profissionais de saúde usam EPI ao realizar procedimentos geradores de partículas aerossóis, incluindo, luvas, batas de manga comprida, proteção ocular e respiradores (N95 ou equivalente). Sempre que possível, realizar tais procedimentos em quartos adequadamente ventilados.

Legenda: EPI - equipamento de proteção individual.

Tendo em conta os dados epidemiológicos atualmente disponíveis, tudo aponta para que ocorra a transmissão do animal ao homem e a transmissão pessoa a pessoa. Nas regiões endémicas, as transmissões esporádicas entre animais podem ser amplificadas em circunstâncias especiais, como por exemplo, na época de acasalamento dos camelos.² Para evitar a transmissão pessoa a pessoa e em unidades hospitalares, o doente deverá ser internado num quarto de isolamento com ventilação adequada (seis a doze renovações de ar/hora) e preferencialmente com pressão negativa e casa de banho privativa. Se existirem vários casos, os doentes devem ser isolados por coortes, havendo, de igual modo, coortes de profissionais para os mesmos. A utilização de EPI é fundamental, devendo a entrada de profissionais estar absolutamente restrita aos cuidados indispensáveis ao doente.³⁷

A transmissão do vírus já ocorreu em unidades hospitalares de diversos países, incluindo a transmissão de doentes a profissionais de saúde e a outros doentes hospitalizados. Para tal contribui o atraso no diagnóstico, uma vez que a sintomatologia pode ser inespecífica. Segundo a OMS, a prevenção da infeção em contexto hospitalar deve incluir, para além dos procedimentos considerados *standard*, também, precauções na execução de

todos os procedimentos que possam induzir aerossóis (intubação, ventilação não-invasiva, ventilação manual prévia à intubação, broncoscopia, traqueostomia, aspiração da via-aérea). Os profissionais de saúde que estiveram em contacto com doentes suspeitos ou confirmados com MERS, devem ser vigiados durante 14 dias após o último dia de exposição. A vigilância inclui a medição diária da temperatura corporal e a monitorização do aparecimento de sintomas respiratórios. Os profissionais de saúde em que a infeção por MERS-CoV foi confirmada, devem ser, de imediato, isolados.

A introdução de programas de vacinação para os camelos e a eliminação de camelos com MERS-CoV (deverão ser realizados testes serológicos e virológicos que permitam a identificação dos animais infetados) são algumas das medidas, também utilizadas, no controlo de uma possível epidemia.⁴¹ Os residentes e os viajantes para regiões endémicas, devem evitar o contacto com animais doentes, (especialmente camelos) e com os fluidos, tecidos e fezes desses animais.

Conclusões

O progresso verificado no conhecimento deste novo coronavírus, designado por MERS-CoV, tem sido grande, no entanto, muitas questões permanecem por clarificar, tais como a sua origem, o seu reservatório e os mecanismos exatos da sua transmissão. A maioria dos casos notificados verificou-se no Médio Oriente mas, numa era de intensa globalização e de facilidade de transporte entre todas as partes do Mundo, a doença, espalhou-se a vários continentes e todos os países se devem preparar para a possibilidade de terem de receber, tratar e conter casos importados e impedir que haja maior disseminação da doença. Uma vez que o tratamento é essencialmente de suporte, é necessário mobilizar esforços para o desenvolvimento rápido de antivíricos e de vacina eficazes. Até lá, os profissionais de saúde devem estar sempre atentos e manter um elevado grau de suspeição (epidemiológica e clínica) em relação a esta doença. A história epidemiológica cuidadosa é na maioria das vezes a chave para o diagnóstico precoce e para permitir acionar todas as medidas de prevenção e de controlo da infeção.

Por fim, é necessário aconselhar as populações, especialmente os viajantes para zonas endémicas, quanto ao risco de aquisição da doença e quanto às medidas higiénicas e cuidados que devem respeitar de forma a preveni-la.

Agradecimentos

Ao meu orientador de tese, o Dr.º Fernando Maltez, pela inesgotável disponibilidade, paciência, atenção e rigor que demonstrou ao longo da elaboração deste artigo de revisão.

À Clínica Universitária de Doenças Infeciosas, dirigida pela Prof.^a Doutora Emília Valadas, por ter aceite a minha candidatura para realização da tese nesta área.

À minha família e namorado, pelo apoio incondicional e constante com que me presentearam durante os últimos seis anos.

Bibliografia

1. Zaki, A., van Boheemen, S., Bestebroer, T., and Osterhaus A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367(19):1814-20.
2. Chan, J., Lau, S., To, K., Cheng, V., Woo, P., and Yuen K. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 28:465-522
3. Pascal, K., Coleman, C., Mujica, A. et al. (2015) Pre and postexposure efficacy of fully human antibodies against Spike protein in a novel humanized mouse model of MERS-CoV infection. *Proc Natl Acad Sci* 112(28):8738-43.
4. Cowling, B., Park, M., Fang, V., Wu, P., Leung, G., and Wu J. (2015). Preliminary epidemiologic assessment of MERS-CoV outbreak in South Korea, May-June 2015. *Euro Surveill* 20:7-13
5. Lai, M. M.C., Perlman, S., and Anderson L.J. Coronaviridae. 2007 In: D.M. Knipe and P. M. Howley, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1305-35
6. Woo, P., Lau, S., Lam, C. et al. (2009). Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J Virol* 83(2):903-17.
7. Pillaiyar, T., Manickam, M., and Jung S. (2015). Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV): An Updated Overview and Pharmacotherapeutics. *Med chem* 5:361-72.
8. Ying, T., Li, H., Dimitrov, D., and Jiang S. (2015). Development of human neutralizing monoclonal antibodies for prevention and therapy of MERS-CoV infections. *Microbes Infect* 17(2):142-8.
9. Zhang, N., Jiang, S., and Du L. (2014). Current advancements and potencial strategies in the development of MERS-CoV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13(6):761-74.
10. Mir, K., Neuhaus, K., Scherer, S., Bossert, M., Schober, S. (2012). Predicting Statistical Properties of Open Reading Frames in Bacterial Genomes. *PLoS ONE* 7(9)

11. McBride, R., and Fielding B. (2012). The role of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-coronavirus accessory proteins in virus pathogenesis. *Viruses* 4:2902-23.
12. Hurst, K., Ye, R., Goebel, S., et al. (2010). An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol* 84:10276-88.
13. Milne-Price, S., Miazgowicz, K., and Munster V. (2014). The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV). *Pathog Dis*, 71(2):119-34.
14. Kayali, G., and Peiris J. (2015). A more detailed picture of the epidemiology of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Lancet Infect Dis* 15:495-97
15. Mackay, I., and Arden K. (2015). Middle East respiratory syndrome: An emerging coronavirus infection tracked by the crowd. *Virus Res* 202: 60-88.
16. Al-Abdallat, M., Payne, D., Alqaswari S. et al. (2014). Hospital-Associated Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: A Serologic, Epidemiologic, and Clinical Description. *Clin Infect Dis* 59:1225-33
17. WHO.org (Internet). WHO emergency page on MERS-CoV: situation report, risk assessment, maps and epicurves, technical guidances. Available from: <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>
18. The WHO MERS-CoV Research Group. (2013). State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLOS Currents Outbreaks*.
19. Assiri, A., Al-Tawfiq, J., and Al-Rabeeah A. (2013). Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 13:752-61
20. Mailles, A., Blanckaert, K., Chaud, P., et al. (2013). First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission. *Euro Surveill* 18(24):1-5
21. Abroug, F., Slim, A., and Ouane-Besbes L. (2013). Family cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections, Tunisia. *Emerg Infect Dis* 20:1527-30

22. Puzelli, S., Azzi, A., Santini, MG., et al. (2013). Investigation of na imported case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection in Florence, Italy. *Euro Surveill* 18(34):1-4
23. Tsiodras, S., Baka, A., Mentis, A., et al. (2014). A case of imported Middle East Respiratory Syndrome coronavirus infection and public health response. *Euro Surveill* 19(16):1-6
24. Kapoor, M., Pringle, K., Kumar, A., et al. (2014). Clinical and Laboratory Findings of the First Imported Case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus to the United States. *Clin Infect Dis* 59(11):1511-8
25. Kraa–Dirkzwager, M., Timen, A., Dirksen, K., et al. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infections in two returning travellers in the Netherlands. *Euro Surveill* 19(21):1-6
26. Sachan, D. (2015). Korean MERS virus is not a mutation, say experts. *BMJ* 350:3243.
27. Butler, D. (2013). Tensions linger over discovery of coronavirus. *Nature News*, 493.
28. Gralinski, L., and Baric R. (2015). Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J Pathol* 235: 185-95.
29. Zhao, J., Perera, R., Kayali, G., Meyerholz, D., Perlman, S., and Peiris M. (2015). Passive Immunotherapy with Dromedary Immune Serum in an Experimental Animal Model for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Virol* 89(11):6117-20.
30. Wang, Q., Qi, J., Yuan, Y. et al. (2014). Bat Origins of MERS-CoV Supported by Bat Coronavirus HKU4 Usage of Human Receptor CD26. *Cell Host Microbe* 16(3):328-37.
31. Liu, Q., Xia, S., Sun, Z. et al. (2015). Testing of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication inhibitors for the ability to block viral entry. *Antimicrob Agents and Chemother* 59: 742-4.
32. Raj, V., Mou, H., and Smith, S., et al. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495(7440):251-4.
33. Xia, S., Liu, Q., Wang, Q. et al. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res* 194:200-10.
34. Zhou, J., Chu, H., Li, C. et al. (2014). Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and

- chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J Infect Dis* 209(9):1331-42.
35. Scheuplein, V., Seifried, J., Maiczky, A. et al. (2015). High secretion of interferons by human plasmacytoid dendritic cells upon recognition of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 89(7):3859-69.
 36. CDC.org (Internet). CDC Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Hospitalized patients with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (updated 2015 June). Available from: <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/infection-prevention-control.html>
 37. DGS.org (Internet). Lisboa: Síndrome Respiratória do Médio Oriente. Infecção pelo novo Coronavírus Middle East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) (updated 2015 Aug 5). Available from: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0082015-de-30062015.aspx>
 38. Al-Tawfiq, J.A; Hinedi, K.; Ghandour, J., et al. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus: a case-control study of hospitalised patients. *Clin Infect Dis* 59:160-5
 39. Memish, Z., Al-Tawfiq, J., Assiri, A., et al. (2014). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Disease in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 33:904-6
 40. Payne, D., Iblan, I., Alqasrawi, S., Al Nsour, M., et al. (2014). Stillbirth During Infection With Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Infect Dis*. 209(12):1870-2
 41. Haagmans, B., and Osterhaus A. (2014). Neutralizing the MERS coronavirus threat. *Sci Transl Med* 6: 235.
 42. Sharif-Yakan, A., and Kanj S. (2014). Emergence of MERS-CoV in the Middle East: Origins, Transmission, Treatment, and Perspectives. *PLoS Pathog* 10:12.
 43. Wilde, A., Jochmans, D., Posthuma, C. et al. (2014). Screening of an FDA-Approved Compound Library Identifies Four Small-Molecule Inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents and Chemother* 58(8):4875-84.
 44. Woodland, D. (2014). Progress Toward a Vaccine for Middle-Eastern respiratory syndrome. *Viral Immunol* 27(10):483.
 45. Yao, Y., Bao, L., Deng, W. et al. (2014). An Animal Model of MERS Produced by Infection of Rhesus Macaques With MERS Coronavirus. *J Infect Dis* 209(2):236-42.

46. Khalid, M., Al Rabiah, F., Khan, B., Al Mobeirek, A., Butt, T., and Al Mutairy E. (2015). Ribavirin and interferon (IFN)-alpha-2b as primary and preventive treatment for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): a preliminar report of two cases. *Antivir Ther.* 20:87-91.
47. Shalhoub, S., Alzahrani, A., Simhairi, R., and Mushtaq A. (2015). Successful recovery of MERS-CoV pneumonia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *J Clin Virol.* 62:69-71.
48. Jiang, L., Wang, N., and Zuo T. et al. (2014). Potent Neutralization of MERS-CoV by Human Neutralizing Monoclonal Antibodies to the Viral Spike Glycoprotein. *Science Transl Med*, 6.